

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
27 septembre 2001 (27.09.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/70231 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

A61K 31/52, A61P 25/00

(FR). MEIJER, Laurent [FR/FR]; 16, rue de Bir-Hakeim,
F-29682 Roscoff (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR01/00850

(74) Mandataire : BREESE-MAJEROWICZ; 3, avenue de
l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international : 21 mars 2001 (21.03.2001)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

00/03673

22 mars 2000 (22.03.2000)

FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE -CNRS- [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange,
F-75794 Paris Cedex 16 (FR). INSERM [FR/FR]; 101,
rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : TIMSIT,
Serge [FR/FR]; 112 ter, avenue de Suffren, F-75015
Paris (FR). CAVELIER, Pauline [FR/FR]; 75 Grand
Rue, F-67000 Strasbourg (FR). BEN-ARI, Yehezkel
[FR/FR]; 2, quai de Rive Neuve, F-13001 Marseille (FR).
KHRESTCHATISKY, Michel [FR/FR]; Chemin de
Sauveclare, Quartier Saint-Barthélemy, F-13390 Auriol

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations,
se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: USE OF SUBSTANCES MODULATING THE EXPRESSION OR THE FUNCTION OF A PROTEIN INVOLVED IN
THE CELL CYCLE FOR TREATING OR PREVENTING ACUTE NEURAL INJURIES

(54) Titre : UTILISATION DE SUBSTANCES MODULATRICES DE L'EXPRESSION OU DE LA FONCTION D'UNE PRO-
TEINE IMPLIQUÉE DANS LE CYCLE CELLULAIRE POUR LE TRAITEMENT OU LA PREVENTION DES LÉSIONS NEU-
RALES AIGÜES

(57) Abstract: The invention concerns the use of a substance modulating the expression or the function of the protein involved in the
cell cycle for preparing a medicine for treating or preventing acute non-apoptotic excitotoxic neural injuries. More particularly, the
invention concerns the treatment or prevention of acute non-apoptotic excitotoxic neural injuries of cerebral ischemia and epilepsy.

(57) Abrégé : La présente invention concerne l'utilisation d'une substance modulatrice de l'expression ou de la fonction d'une pro-
téine impliquée dans le cycle cellulaire pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention des lésions
neurales aiguës excitotoxiques non-apoptotiques. L'invention concerne plus particulièrement le traitement ou la prévention des lésions
neurales aiguës excitotoxiques non-apoptotiques de l'ischémie cérébrale et de l'épilepsie.

WO 01/70231 A2

UTILISATION DE SUBSTANCES MODULATRICES DE
L'EXPRESSION OU DE LA FONCTION D'UNE PROTEINE IMPLIQUEE DANS
LE CYCLE CELLULAIRE POUR LE TRAITEMENT OU LA PREVENTION DES
LÉSIONS NEURALES AIGÜES.

5

La présente invention concerne le domaine du
traitement et de la prévention de maladies
neurodégénératives liées à des lésions neurales aiguës
excitotoxiques. L'invention s'intéresse tout
10 particulièrement au traitement et à la prévention de
l'épilepsie, plus particulièrement à l'état de mal
épileptique. L'invention s'intéresse aussi tout
particulièrement au traitement et à la prévention de
l'ischémie cérébrale qu'ils s'agissent d'ischémie cérébrale
15 focale ou globale, de l'hypoxie cérébrale suite à un arrêt
cardiaque, de la circulation extra-corporelle lors de la
chirurgie cardiovasculaire, de la chirurgie des vaisseaux du
cou, nécessitant ou non un clampage des vaisseaux, des
traumatismes crâniens et de toute situation provoquant une
20 hypoxie ou une anoxie cérébrale.

La destruction du tissu cérébral peut survenir
au cours de différents phénomènes morphologiques.

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire
qui s'est développé avec la naissance des organismes
25 multicellulaires. Dans cette description initiale,
l'apoptose est un phénomène physiologique que l'on retrouve
à travers toute la phylogénie. À cet égard, la construction
du cerveau en est un exemple frappant. Le cerveau peut se
structurer, au cours du développement, grâce à la mort
30 massive des neurones (plus de 50%).

Le terme apoptose provient du grec «chute des
feuilles », décrit par Kerr (1972). Il fait référence à des
critères morphologiques différents de la nécrose. En
microscopie électronique, l'apoptose se caractérise
35 précocement par une condensation du cytoplasme et de la

chromatine, puis par la survenue de convolutions des membranes cytoplasmique, et nucléaire qui vont ensuite former les corps apoptotiques. Physiologiquement, l'apoptose ne provoque pas d'inflammation. Il est apparu que l'apoptose
5 était associée, en général, mais pas obligatoirement, à des phénomènes biochimiques caractéristiques mettant en jeu un véritable programme de mort appelé de manière consacrée, la mort cellulaire programmée (MCP). Le terme MCP a en fait deux sens. Le premier historiquement fait référence à une
10 mort prévue au cours du développement. Puis le terme a été modifié pour signifier qu'il est associé à un programme génétique impliquant la synthèse de protéines spécifiques.

La nécrose se caractérise, quant à elle, par un gonflement des organites intracellulaires et du
15 cytoplasme puis une lyse osmotique. La libération de ses constituants provoque un afflux de macrophages et des lésions tissulaires. Une inflammation est donc présente au cours de la nécrose qui est le plus souvent un phénomène pathologique.

20 Ainsi la mort par nécrose et celle par apoptose sont associées respectivement, classiquement, à des phénomènes passifs ou actifs. Les phénomènes actifs mettent en jeu un programme de mort cellulaire avec activation de protéines (famille des caspases, famille de Bcl-2) alors que
25 les phénomènes passifs ne mettent pas en jeu un programme de mort cellulaire.

Il y a donc d'un côté des aspects morphologiques et d'un autre côté des phénomènes biologiques jouant un rôle dans la mort cellulaire. On a cru pendant longtemps que les
30 aspects morphologiques impliquaient des mécanismes biologiques particuliers, en fait cette compréhension est actuellement en train d'être modifiée. L'idée apoptose-mort programmée, nécrose-absence de mort programmée, n'est plus exacte. Par exemple on a décrit des apoptoses caspases-
35 dépendantes, mais aussi des apoptoses caspases indépendantes

(Borner et al., 1999). Il y a des formes de passages entre apoptose et nécrose, ainsi des cellules en apoptose pour lesquelles la mort programmée a été bloquée peuvent avoir les caractéristiques morphologiques de la nécrose (Kitanaka et al., 1999; Chautan et al., 1999).

Au cours de l'ischémie cérébrale, les aspects morphologiques ont des aspects à la fois réminiscent d'apoptose et des aspects réminiscent de nécrose indépendamment du fait qu'il y ait ou non une mort programmée. Il n'est même pas certain qu'il y ait des neurones qui meurent par apoptose classique au cours de l'ischémie cérébrale (MacManus et al., 1999). Des travaux réalisés par Portera-Cailliau et al. (1997) illustrent le continuum morphologique qui peut exister après excitotoxicité entre nécrose et apoptose. Ces auteurs ont injecté dans le striatum différents agonistes glutamatergiques pour stimuler les récepteurs NMDA et non-NMDA et ont ensuite étudié l'aspect morphologique des neurones. Après lésion excitotoxique tous les aspects intermédiaires entre nécrose et apoptose sont observables. Après injection de NMDA, la morphologie cellulaires est plutôt de type nécrotique alors qu'après injection d'agonistes non-NMDA elle est plutôt de type apoptotique.

L'invention est fondée sur la compréhension de mécanismes moléculaires impliqués dans la mort neuronale et en particulier la mort neurale liée au phénomène d'excitotoxicité. La mort neuronale liée à l'excitotoxicité est due à une libération excessive de glutamate qui va entraîner des lésions. La mort associée à l'excitotoxicité peut provoquer une mort de type programmée pouvant mettre en jeu l'activation de produit de gènes. Cette mort de type programmée peut s'associer, d'un point de vue morphologique, au cours de l'excitotoxicité et de l'ischémie cérébrale à des aspects morphologiques diverses de nécrose, d'apoptose,

d'autophagocytose voire d'aspects mixtes (apoptose/nécrose)..
On rencontre ce phénomène au cours de l'ischémie et de
l'épilepsie et dans de nombreuses maladies
neurodégénératives, comme les maladies de Parkinson,
5 d'Huntington, la sclérose latérale amyotrophique.

Les autres cellules du système nerveux central
peuvent aussi être sensibles à l'excitotoxicité. Par exemple
les oligodendrocytes soumis à des agonistes glutamatergiques
tels que le kainate peuvent aussi dégénérer (Matute et al.,
10 1997; Sanchez-Gomez et Matute; 1999)

Les inventeurs se sont intéressés tout
particulièrement aux lésions neurales aiguës
caractéristiques de l'épilepsie et de l'ischémie cérébrale,
alors que les maladies neurodégénératives de type Alzheimer
15 ou Parkinson sont des maladies chroniques avec une mort
essentiellement neuronale progressive sur plusieurs années.

Dans le cas de l'épilepsie et de l'ischémie
cérébrale, la mort neurale est aiguë et deux types de
lésions neurales sont observés :

20 - la mort des neurones, des astrocytes et des
oligodendrocytes,

- la prolifération des cellules de
l'inflammation et en particulier les astrocytes et la
microglie qui par leurs effets inflammatoires ont un effet
25 délétère sur la mort cellulaire (Zoppo et al., 2000). Il
peut s'agir aussi de cellules en dehors du système nerveux
central tel que les cellules endothéliales, les leucocytes.

Il est connu dans l'art antérieur que les
30 cyclines sont des molécules clefs du cycle cellulaire,
impliquées dans la phosphorylation de la molécule Rb de
façon à permettre la poursuite du cycle cellulaire. Leurs
propriétés mitotiques nécessitent qu'elles soient associées
aux CDKs (kinases cyclines dépendantes) pour former les
35 complexes responsables de la phosphorylation de la molécule

Rb. Les cyclines D peuvent aussi agir indépendamment des cdk comm el'on montré des travaux récents (Zwijssen et al., 1997).

5 Or, les inhibiteurs de CDK sont connus pour leur propriété antimitotique et ont déjà été proposés comme anticancéreux ou pour prévenir et traiter la dégénération tissulaire notamment l'apoptose des cellules neuronales. Ainsi, plusieurs demandes de brevet internationales PCT WO 99 43 676 et WO 99 43 675 proposent des inhibiteurs de CDK
10 en tant qu'inhibiteur de la progression du cycle cellulaire pour une utilisation dans le traitement ou la prévention de l'apoptose neuronale par exemple pour les maladies cérébrovasculaires.

15 On a également déjà proposé dans l'art antérieur l'utilisation d'inhibiteur de la GSK3 pour protéger les neurones (Maggirwar, S. B. et al., 1999, J. Neurochem. 73, 578-586).

20 Le rôle des cyclines dans l'ischémie cérébrale et l'excitotoxicité est sujet à débat. Certains auteurs pensent que la cycline D1 est associée à la réparation neuronale, d'autre qu'elle pourrait être impliqué dans la mort neuronale. *In vivo*, Wiessner et al. (1996) ont mis en évidence la cycline D1 dans la microglie mais pas dans les neurones après ischémie cérébrale globale. Li et al (1997)
25 ont observé que la protéine cycline D1 étaient augmentée dans les neurones et les oligodendrocytes après ischémie focale. Comme ces cellules n'étaient pas en dégénérescence les auteurs ont proposé que la cycline D1 pourrait être impliquée dans la réparation de l'ADN dans des neurones non
30 touchés de manière irrémédiable. *In vitro*, Small et al. (1999) ont étudié l'expression de la cycline D1 sur une culture de neurones corticaux exposés au glutamate. Les auteurs observent une perte d'expression de la cycline D1 après expositions de ces neurones au glutamate et concluent

que la cycline D1 joue plutôt un rôle dans la résistance neuronale à l'ischémie

Dans un modèle d'ischémie globale, Timsit et al. (1999), ont montré que l'expression de l'ARNm et de la protéine cycline D1 étaient augmentées dans les neurones destinés à mourir mais aussi dans des neurones résistants. Ces auteurs ont proposé alors que la cycline D1 puisse être un modulateur de la mort programmée, mais n'ont pu trancher de manière formelle entre un effet délétère ou bénéfique. Les récents résultats *in vitro* obtenus par les Inventeurs suggèrent que la cycline D1 et ses partenaires pourraient avoir un effet délétère sur la mort neuronale.

Les inventeurs ont ainsi montré une augmentation de l'expression de cyclines, plus particulièrement de cycline D1, dans les neurones lors de l'ischémie ou de l'épilepsie (Timsit, S. et al., 1999, Eur. J. Neurosci. 11:263-278). Cette observation *in vivo* a été confirmée sur un modèle de mort neuronale *in vitro* par excitotoxicité mis au point pour cette étude. Cet enseignement semble toutefois contradictoire avec plusieurs articles de l'art antérieur où il est considéré que la cycline D1 n'est pas impliquée dans l'apoptose.

Les inventeurs ont maintenant montré sur le modèle défini ci-dessus que l'utilisation de substances inhibitrices de CDKs permettait de diminuer la mort neuronale aiguë excitotoxique.

Or, dans le cas des lésions chroniques rencontrées par exemple dans le Parkinson ou l'Alzheimer, le médicament comprenant une substance inhibitrice de CDKs est administré de façon chronique avec des effets secondaires sur les cellules en division. Au contraire, dans le cas de lésions aiguës rencontrées dans l'ischémie cérébrales et l'épilepsie, un médicament est administré pendant une période courte donc avec peu d'effet secondaire sur la division cellulaire.

L'invention a donc pour objet l'utilisation d'une substance modulatrice de l'expression ou de la fonction d'une protéine impliquée dans le cycle cellulaire pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention des lésions neurales aiguës excitotoxiques non-apoptotiques.

On entend par lésions neurales, des lésions pouvant détruire tous les types cellulaires du système nerveux et plus particulièrement les neurones, les astrocytes, les oligodendrocytes, la microglie mais aussi leurs précurseurs dans le système nerveux y compris les cellules souches pouvant donner des astrocytes, des oligodendrocytes, des neurones et de la microglie.

Ces lésions sont celles rencontrées spécifiquement dans l'ischémie ou la crise d'épilepsie. Elles sont dues, au moins en partie, au phénomène d'excitotoxicité. Elles font donc référence à des phénomènes pathologiques bien connus en pathologie humaine et non à des aspects morphologiques. Les aspects morphologiques peuvent être proches d'aspect de nécrose, d'apoptose, d'aspects mixtes nécrose/apoptose et de mort par autophagocytose. Parmi les lésions de nécrose on décrit les paleurs cellulaires (pale cell change), les modifications ischémiques cellulaires (ischemic cell change) et les cellules fantômes (ghost cells). Enfin de récentes revues évoque la possibilité de passage entre différents formes de mort : nécrose et apoptose (Lipton et al.; Physiological review 1999; 79:1432-1532).

On entend par lésions aiguës toutes lésions qui se produisent en moins de 30 jours qui sont dans ce contexte dues à l'ischémie cérébrale ou aux crises d'épilepsie.

L'invention concerne donc tout particulièrement l'utilisation d'une substance modulatrice de l'expression ou de la fonction d'une protéine impliquée dans le cycle cellulaire pour la préparation d'un médicament destiné au

traitement ou à la prévention des lésions neurales aiguës excitotoxiques non-apoptotiques des neurones, des astrocytes, ou des oligodendrocytes, ou de leurs précurseurs, au cours de l'ischémie cérébrale ou de l'épilepsie, plus particulièrement l'état de mal épileptique.

L'invention s'intéresse tout spécialement au traitement ou à la prévention des lésions neurales aiguës excitotoxiques non-apoptotiques résultant d'une ischémie cérébrale survenant au cours d'une situation provoquant une hypoxie ou une anoxie cérébrale. Parmi les situations provoquant une hypoxie ou une anoxie cérébrale, on peut citer l'arrêt cardiaque, la mise en circulation extra-corporelle lors de la chirurgie cardiovasculaire, la chirurgie des vaisseaux du cou nécessitant ou non un clampage des vaisseaux, les traumatismes crâniens.

On entend par protéine impliquée dans le cycle cellulaire, toute protéine qui joue un rôle dans le cycle cellulaire sur certains types cellulaires. Par cycle cellulaire, on entend la phase G1, la phase S, la phase G2, la phase M mais aussi la phase G0. Ainsi, on entend plus particulièrement par protéine impliquée dans le cycle cellulaire, une protéine qui joue un rôle dans la progression du cycle cellulaire, c'est à dire dans la passage d'une phase à l'autre. Il s'agit de protéine qui peuvent être produite par un type cellulaire qui ne se divise plus. Par exemple, un neurone différencié ne se divise pas, néanmoins il peut exprimer certaines molécules du cycle cellulaire sans toutefois que ces molécules entraînent une division cellulaire. En outre, une protéine impliquée dans la progression du cycle cellulaire d'un type de cellule peut être produite par un autre type de cellule.

On entend par substance modulatrice de l'expression, toute substance capable de modifier la

quantité d'ARNm produite, la quantité de protéine produite ou de modifier la demi-vie d'un ARNm ou d'une protéine par exemple en modifiant la dégradation de l'ARNm ou la dégradation de la protéine. Cette modulation peut être positive ou négative, c'est à dire qu'elle peut augmenter la quantité de protéine active ou la diminuer.

On entend pas substance modulatrice de la fonction d'une protéine toute substance capable de modifier l'activité d'une protéine ou d'un complexe protéique sur une cible. L'invention envisage plus particulièrement, un substance capable de moduler la phosphorylation d'une cible, en l'augmentant ou l'inhibant. A titre d'exemple préféré, l'invention concerne une substance capable de moduler le degré de phosphorylation de Rb par une Cdk.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation d'une substance modulatrice de l'expression ou de la fonction d'une cycline, et plus particulièrement d'une cycline D, d'une cdk ou leur complexe. On entend aussi par substance modulatrice de l'expression ou de la fonction d'une cycline, d'une cdk ou leur complexe, toute substance modulatrice de l'expression ou de la fonction de tout complexe impliquant la cycline, la cdk, ou les deux. Des exemples de complexes sont : cycline/autre protéine ou complexe de protéines; cdk/autre protéine ou complexe de protéines; cycline/cdk/autre protéine ou complexe de protéines.

L'invention concerne plus particulièrement une substance modulatrice de l'expression ou de la fonction de la cycline D1 et/ou de la cdk5 et/ou du complexe cycline D1/Cdk5

Ces substances présentent un effet sur l'excitotoxicité neuronale et donc sur la mort neuronale, mais aussi sur la mort des astrocytes et des oligodendrocytes et sur l'effet délétère indirect lié à la

prolifération des astrocytes et de la microglie impliquée dans le phénomène d'excitotoxicité.

L'invention concerne donc tout particulièrement, le traitement ou la prévention de l'ischémie cérébrale et l'épilepsie. En effet, les travaux réalisés dans le cadre de la présente invention ont permis de montrer qu'une substance modulatrice de l'expression ou de la fonction des cyclines, des cdk ou de leur complexe permet diminuer l'étendue des lésions provoquées par l'ischémie ou l'épilepsie. Les cellules cibles qui sont visées dans l'utilisation selon l'invention sont, d'une part les neurones et éventuellement les autres cellules qui meurent telles que les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie, et d'autre part, les cellules qui prolifèrent et qui ont un effet délétère sur l'étendue des lésions. L'invention se rapporte donc à une méthode de traitement ou de prévention de l'ischémie cérébrale ou de l'épilepsie comprenant l'administration à un patient d'une quantité efficace sur les lésions neurales aiguës d'une ou plusieurs des substances modulatrices de l'expression ou de la fonction d'une protéine impliquée dans le cycle cellulaire.

L'invention envisage à titre de substance modulatrice de l'expression ou de la fonction d'une protéine impliquée dans le cycle cellulaire, une substance choisie parmi :

- les inhibiteurs de l'expression des cyclines,
- les inhibiteurs de kinases cyclines dépendantes, comme les analogues de purines par exemple les dérivés de l'olomoucine et roscovitine, les paullones, les indirubines, l'hymenisaldisine, le flavopiridol, etc...
- les inhibiteurs du complexe cycline/kinases cyclines dépendantes.

Des inhibiteurs de l'expression des cyclines sont par exemple :

- La rapamycine qui agit sur l'ARNm de la cycline D1 et sur la stabilité de la protéine. (Hashemolhosseini et al., 1998). Par ailleurs, il a été montré que la rapamycine pouvait diminuer la taille des infarctus cérébraux.

- La glycogene synthase kinase, comme la GSK3, qui régule la protéolyse de la cycline D1. (Diehl et al., 1998)

- Les statines, et en particulier la lovastatine qui modifie l'expression de la cycline D1 (Oda et al. 1999; Rao et al., 1999; Muller et al., 1999) via des protéines inhibitrices telles que p21.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront de la description qui suit concernant l'effet du kaïnate sur la mort neuronale, et le rôle d'inhibiteurs des cdk sur cette mort neuronale.

I - Matériel et méthode.

1) Culture primaire de cellules de l'hippocampe.

Les cultures cellulaires ont été préparées à partir de rats Wistar âgés de 2 jours. Les hippocampes ont été disséqués dans du PBS sans calcium, ni magnésium. Les tissus ont été coupés en petit morceau et incubés en présence de protéases et de Dnase. L'action des protéases a été stoppée par l'action d'un sérum. Les cellules ont été ensuite dissociées mécaniquement. puis resuspendues dans un milieu de culture. Des cellules cultivées pendant 10-12 jours furent utilisées pour les expériences.

2) Exposition au kaïnate et étude de la mortalité cellulaire.

Les cultures cellulaires de l'hippocampe ont été exposées à du kaïnate (20 - 75 μ M) pendant des temps

différents (2 - 22 heures). Le kaïnate a été dilué dans de l'eau afin de préparer une solution stock de 20 mM. La quantité adéquate de la solution stock a été ensuite ajoutée à 200 µl de milieu conditionné provenant de la culture cellulaire. Les expériences contrôles ont été conduites dans les mêmes conditions sauf le stock de kaïnate qui été remplacé par de l'eau stérile.

La mort neuronale a été analysée par microscopie en contraste de phase et l'utilisation de deux marqueurs de mort : l'iodure de propidium et la coloration Hoechst (Bisbenzimidazole).

Le comptage a été réalisé sur des cultures d'hippocampes exposées à du kaïnate 20 µM. Deux boîtes par condition ont été au moins évaluées.

L'iodure de propidium (7,5 µM) a été ajouté à la culture 1 heure avant le comptage cellulaire. Les cellules marquées ont été comptées à l'aide d'un microscope à fluorescence avec un grossissement faible à partir de champs choisis au hasard. Au moins 5 champs dans deux boîtes ont été comptés par conditions sur trois cultures indépendantes. Les résultats ont été exprimés en pourcentage du nombre total de neurones observés en microscopie avec contraste de phase.

Le marquage par le Hoechst (Bisbenzimidazole) a été réalisé après fixation des cellules au paraformaldéhyde 4%. Les cellules brillantes à noyau condensées ont ensuite été comptées. Au moins 5 champs dans deux boîtes ont été comptés par conditions sur une ou trois cultures indépendantes. Les résultats ont été exprimés en pourcentage du nombre total de neurones observées en microscopie avec contraste de phase.

3) Immunocytochimie et coloration Hoechst (Double marquage).

Les cellules hippocampiques sur des lamelles de verre ont été fixées dans le paraformaldéhyde 4% pendant 20

minutes puis lavées en PBS et perméabilisées en PBS - 0,2% gelatin - 0,2 % Triton X-100. Un anticorps monoclonal dirigé contre la cycline D1 (Santa Cruz, California, USA) dilué au 1/400, un anticorps polyclonal de lapin (Dako A/S Danemark) dirigé contre la GFAP dilué au 1/800 ont été incubés toute la nuit à 4°C dans le PBS 0.2% gélatine 0,2% Triton X-100. Après lavage, un anticorps de cheval anti-souris dilué au 1/400 (adsorbé chez le rat) (Vector, Burlingame, USA) a été utilisé pendant 1 heure à température ambiante. Après lavage, un complexe avidine-fluorescéine (1/400) a été utilisé en même temps qu'un anticorps de chèvre anti-lapin couplé à la rhodamine (Chemicon, Temecula, USA) pour une incubation de 1 heure. Après lavage, les cellules ont été colorées par le Hoechst Bisbenzimidazole 33.258 (Sigma, St Louis, USA) à 1mg/ml. Les lamelles de verre sont ensuite montées. Les expériences contrôles ont été réalisées en omettant les premiers anticorps, soit la cycline D1 soit la GFAP, soit les deux.

Pour les doubles marquages cycline D1/cdk5, un anticorps monoclonal anti-cycline D1 dilué au 1/100 (Santa Cruz, California, USA) ainsi qu'un anticorps polyclonal de lapin anti-cdk5 dilué au 1/200 ont été utilisés. Après lavage, un anticorps biotinylé anti-lapin dilué au 1/400 (Vector, Burlingame, USA) a été utilisé pendant 1 heure à température ambiante. Après lavage, un anticorps de chèvre anti-souris couplé au TRITC (1/400) (Sigma, St Louis, USA) et un complexe avidine-fluoresceine (1/400) (Vector, Burlingame, USA) ont été utilisés à température ambiante pendant 30 minutes. Les expériences contrôles ont été réalisées en omettant les premiers anticorps, soit la cycline D1 soit la cdk5, soit les deux. Un autre type de contrôle a été réalisé en neutralisant l'anticorps anti-cdk5 par un excès de 10 fois (poids/poids) de peptide immunisant pendant 30 minutes à 30°C.

4) Western blot.

Après exposition des cellules hippocampiques
au kainate, les cellules étaient lavées en PBS puis lysées
dans un tampon de Laemmli. Les échantillons ont été soumis à
sonication et chauffés à 100°C pendant 5 minutes. Une
électrophorèse avec un gel SDS-polyacrylamide de 12 % était
ensuite réalisé. Les protéines ont été ensuite transférées
sur une membrane de nitrocellulose et incubées soit avec un
anticorps monoclonal anti-cycline D1 soit avec un anticorps
polyclonal anti-cdk5 (Santa Cruz, California, USA), ou enfin
un anticorps monoclonal anti- β tubuline classe III (Sigma,
St Louis, USA), un marqueur spécifique neuronal. Le marquage
a été réalisé en utilisant l'anticorps anti-lapin ou l'anti-
corps antisouris couplés à la peroxydase du raifort en
utilisant le kit ECLTM (Amersham Corp., England). Les
expériences contrôles ont été réalisées en omettant les
premiers anticorps.

5) Immunoprécipitations et analyse en Western-
Blot.

Les cerveaux de rat ont été broyés dans un
tampon RIPAE (PBS contenant 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 5
mM EDTA, 1 % aprotinine et 1 % sodium deoxycholate). Les
lysats clarifiés ont été ensuite incubés pendant 2 heures
dans la glace avec un anticorps anti-cdk5 en présence ou en
absence du peptide bloquant correspondant. Les complexes
immuns obtenus furent ensuite récupérés par précipitation
avec la protéine sépharose A (Pharmacia), lavés 3 fois avec
le tampon RIPAE. Les protéines immunoprécipitées ont été
ensuite éluées en les faisant bouillir dans du tampon de
Laemmli, puis fractionnées sur un gel de SDS-polyacrylamide
et transférées sur une membrane (Immobilon-P, Millipore
Corp.) Les membranes ont été ensuite saturées par une
solution bloquante (5% lait écrémé dans 20 mM Tris-HCl, pH
7,6, 0,9% NaCl, 0.2% Tween-20), puis incubées avec soit

l'anti-cycline D1 (1/200), soit l'anti-cdk5 (1/2000) pendant toute la nuit à 4°C. L'immuno-marquage a été réalisé avec des anticorps couplés à la peroxydase du raifort en utilisant le kit ECLTM (Amersham Corp.).

5

6) Traitement par inhibiteur de cdk (ML-1437).

Les cultures hippocampiques ont été exposées à du kaïnate (20 μ M) dans du DMSO pendant 5 heures en présence ou en absence d'un inhibiteur de cdk, un analogue de la roscovitine. L'inhibiteur de cdk a été utilisé à différentes concentrations : 2 μ M, 5 μ M et 10 μ M. La mortalité cellulaire a été déterminée en utilisant l'iodure de propidium comme décrit ci-dessus.

10

15

II - Résultats.

1) La mort neuronale après exposition au kaïnate est retardée et dose dépendante.

Pour évaluer la mort neuronale après exposition au kaïnate deux approches ont été utilisées :

20

- une analyse morphologique;
- l'utilisation de marqueur de mort cellulaire : l'iodure de propidium et la coloration de Hoechst.

25

i) L'analyse morphologique.

L'analyse morphologique quantitative a été faite sur les neurones survivants à différents temps entre 1 heures et 27 heures

30

Le comptage des neurones après exposition à 20 μ M a montré une baisse très forte de la viabilité neuronale entre 1 heure et 5 heures.

ii) Marqueurs de mort cellulaire.

L'utilisation de l'iodure de propidium (Figure 1) à 2, 5 et 22 heures a confirmé les données d'observation

35

morphologiques. La figure 1 représente la cinétique de la mort neuronal kaïnate dépendante révélée par l'iodure de propidium. Les cultures hippocampiques ont été exposées à différentes concentrations de kaïnate (20 μ M, 30 μ M, 75 μ M).
5 Le pic de mortalité est à 5 heures après le début du traitement par kaïnate. * $p < 0,05$ par test ANOVA.

Après exposition à 20 μ M de kaïnate, le pourcentage de neurones en dégénérescence augmente progressivement avec un pic de mort à 5 heures. Après
10 exposition des cellules par le kaïnate aux concentrations de 30 à 75 μ M, le pourcentage de neurones en dégénérescence augmente de manière dose dépendante avec une mortalité maximale à 5 heures. Seuls certains neurones étaient propidium positifs alors que les astrocytes étaient toujours
15 propidium négatifs.

Le marquage Hoechst a confirmé les données obtenues avec l'iodure de propidium.

2) La protéine cycline D1 est exprimée dans les neurones vulnérables après traitement au kaïnate.

La figure 2 montre que la cycline D1 est exprimée dans des neurones vulnérables. Observation au microscope à contraste de phase et double ou triple marquage fluorescent à 22 heures (A-F) et 5 heures (G, H, I) après
25 expositions à 20 μ M de kaïnate, culture non exposée au kaïnate (J, K, L). Observation en contraste de phase (A, D): Iodure de propidium (B) et cycline D1 (C, F, I, L); marquage Hoechst (E, H, K); marquage GFAP (G, J). En A, B, C : Des neurones (A, flèches) iodure de propidium positifs (B) et cycline D1 positifs (C). En D, E, F : Des neurones (D,
30 flèches) sont Hoechst positifs (E) et cycline D1 positifs (F). En G, H, I: un neurone est GFAP négatif (G) avec un noyau condensé (H) et cycline D1 positif (I). En J, K, L, un astrocyte est GFAP positif (J), avec un noyau non-condensé
35 (K) et cycline D1 positif (L). Echelle: 1 cm = 3,33 μ M

La combinaison d'observations en immunofluorescence de la cycline D1 (Fig 2C, F) et de l'observation en contraste de phase (Fig 2A, D) a révélé que la cycline D1 était exprimée dans des neurones. Les doubles marquages cycline D1 (Fig 2C, F) d'une part et iodure de propidium (Fig 2B) ou coloration Hoechst (Fig 2E, H) d'autre part, a révélé que la plupart des neurones exprimant la protéine cycline D1 nucléaire présentait des signes de mort révélée par l'iodure de propidium ou la coloration Hoechst (Fig 2A-F). Dans les expériences contrôles seuls quelques neurones cycline D1 positifs étaient détectées. Par ailleurs quelques astrocytes exprimaient la cycline D1. Mais les astrocytes (GFAP. +) ne présentaient jamais de marquage iodure de propidium positif ou de fragmentation de chromatine (Hoechst). Les expériences contrôles sans premier anticorps ne montraient aucun marquage.

3) L'expression de la protéine cycline D1 est augmentée après traitement au kaïnate.

Des expériences de western blot ont été réalisées sur des extraits protéiques cellulaires exposées ou non au kaïnate. La figure 3 rapporte l'augmentation du taux normalisé de l'expression de la protéine cycline D1 après traitement par le kaïnate. La figure 3 représente l'analyse par Western Blots obtenus à partir d'extraits protéiques de cellules de l'hippocampe exposées au kaïnate en utilisant l'anticorps monoclonal anti-cycline D1 et l'anticorps anti β -tubuline classe III. En A, abscisse : temps d'exposition (h, heures) au kaïnate (75 μ M). En ordonnée : taux moyen d'expression de cycline D1, normalisé par la quantité de neurones, exprimée en pourcentage du contrôle. Il convient de noter l'augmentation d'expression de la protéine cycline D1 après 5 heures d'exposition au kaïnate.

* $p < 0,005$ par test ANOVA. En B, blots représentatifs. Une

bande de 35 Kd et de 70 Kd ont été les seules bandes détectées avec respectivement l'anticorps anti-cycline D1 et l'anticorps anti- β -tubuline classe III.

Comme le traitement par le kaïnate des cultures de l'hippocampe provoquent une mort neuronale et donc une perte neuronale, le taux de cycline D1 a été normalisé par le taux de β tubuline classe III, un marqueur spécifique des neurones. L'analyse quantitative a révélé que le niveau d'expression normalisé de cycline D1 augmentait de manière significative de 100% avant kaïnate à plus de 150% après exposition des cultures par le kaïnate 75 μ M.

4) La cycline D1 et Cdk5 sont co-exprimés dans les neurones en dégénérescence et interagissent dans le cerveau.

Cdk5 est une cycline kinase dépendante (cdk) spécifiquement neuronale. Le double marquage cycline D1/Cdk5 a révélé que la cycline D1 et Cdk5 étaient présentes dans les neurones en dégénérescence. La figure 4 montre l'expression de cdk5 dans les neurones après exposition au kaïnate. Double ou triple marquage de neurones hippocampiques avant (contrôle en A) et après exposition à 75 mM de kainate (B-I). Immunoréactivité Cdk5 (A, B, D, G); coloration Hoechst (C, F, I); Iodure de Propidium (E); Immunoréactivité cycline D1 (H). En A, des neurones (flèches) sont cdk5 positifs. En B, C des neurones (flèches) sont cdk5 positifs (B) avec un noyau condensé (C). En D, E, F, un neurone (flèche), Cdk5 positif (D), iodure de propidium positif (E) avec un noyau condensé (F). En G, H, I un neurone (flèche), Cdk5 positif (G), cycline D1 positif (H) avec un noyau condensé (I)

Les études en western blot après immunoprécipitation de cdk5 révélèrent que la cycline D1 étaient associées à Cdk5.

5) Effet d'inhibiteurs des cdk sur la mort neuronale après exposition au kaïnate.

Afin d'étudier le rôle du complexe cycline D1/cdk5 dans la mort neuronale un inhibiteur des cdk très actif sur cdk5 a été utilisé sur des cultures hippocampiques exposées à 20 μM de kaïnate. La figure 5 montre qu'un inhibiteur de Cdk diminue la mort neuronale après exposition au kaïnate. La figure 5 concerne la culture d'hippocampes traitées 5 heures par du kaïnate et un inhibiteur de Cdk à différentes concentrations (2, 5, 10 μM). La mortalité neuronale a été évaluée par la marquage à l'iodure de propidium avec observation au microscope à fluorescence. Il convient de noter que la mort neuronale est partiellement inhibée par l'inhibiteur de cdk aux concentration de 2 et 5 μM . * $p < 0,005$ par test ANOVA.

Les contrôles ont été effectuées sur des culture avec ou sans kaïnate en combinaison ou non avec l'inhibiteur de Cdk. Sur les expériences contrôles avec kaïnate, en l'absence d'inhibiteur la mort neuronale était proche de 65 % avec une augmentation de la mort neuronale de 150 % par rapport aux cultures sans kaïnate. Au contraire, sur les cultures avec kaïnate en présence de concentration d'inhibiteur de cdk de 2 ou 5 μM la mort neuronale était proche de 45 %. Même avec des fortes doses d'inhibiteurs (10 μM), la mort neuronale reste élevée.

III - Discussion.

Les premiers travaux (Timsit et al., 1999) ont montré que l'expression de la cycline D1 était augmentée dans les neurones vulnérables *in vivo* mais aussi, à un niveau moindre dans des neurones résistants. Il n'était donc pas démontré que cette expression avait un effet délétère ou bénéfique. Les présents travaux *in vitro* ont confirmé l'augmentation d'expression de la protéine cycline D1 après

exposition de cultures de neurones et d'astrocytes au kainate, un analogue du glutamate. De plus, l'étude en immunohistochimie a permis de montrer que ce sont les neurones en dégénérescence qui expriment la protéine cycline D1 dans leur noyau. Cette expression survient précocement avant la fragmentation de l'ADN comme l'avait déjà montré les travaux *in vivo*. L'étude par double marquage cycline D1/Cdk5 a montré que les neurones en dégénérescence co-expriment ces 2 protéines suggérant qu'elles peuvent s'associer. L'étude en Western blot sur des cerveaux de rat normaux a confirmé la possibilité d'association entre la cycline D1 et la molécule Cdk5. Enfin l'utilisation d'inhibiteur de Cdk, préférentiellement actif sur Cdk5, a montré un effet protecteur de ce produit chimique aux doses situées entre 2 et 5 μM . En revanche au dose de 10 μM ce produit ne s'est plus révélé protecteur.

Les aspects morphologiques associés au kainate analysés en contraste de phase, avec un marqueur Hoechst et l'iodure de propidium montrent à la fois des aspects d'apoptose et des aspects de nécrose. Les aspects d'apoptose sont caractérisés par la condensation et la fragmentation du noyau visualisées par la coloration Hoechst mais aussi des aspects de nécrose avec rupture de la membrane cytoplasmique visualisé par la coloration au iodure de propidium. Les inhibiteurs de Cdk ont donc un effet neuroprotecteur contre l'excitotoxicité neuronale non-typiquement apoptotique. Ces données sont de plus étayées par les travaux de Leski et al.(1999) qui montrent que la mort neuronale excitotoxique induite par le kainate ne peut être prévenue par l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse d'ARN ou de protéine ou d'inhibiteurs de caspases tels que YVAD-CHO and DEVD-CHO et que donc les critères classiques généralement associés à l'apoptose à savoir la mort programmée et l'activation des caspases ne se retrouvent pas dans la mort excitotoxique induite par le kainate. De même, les

inhibiteurs de caspases ne sont pas toujours actifs sur les modèles d'ischémie cérébrale, ainsi Li et al (2000) ont montré une absence d'effet des inhibiteurs de caspase dans l'ischémie globale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 5 - Khrestchatisky M., Timsit S., Rivera S.,
Tremblay E. and Ben-Ari Y. (1996) Neuronal death and damage
repair: roles of protooncogenes and cell cycle-related
proteins. In J. Kriegstein (Ed.), *Pharmacology of Cerebral
ischemia*. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, pp 41-
56,.
- 10 - Li Y., Chopp M., Powers C., Jiang N. (1997)
Immunoreactivity of cyclin D1/cdk4 in neurons and
oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rats. *J
Cereb Blood Flow Metab.*, 17: 846-856.
- Sherr C.J. (1993) Mamalian G1 cyclins. *Cell* ,
73: 1059-1065.
- 15 - Zwijsen R.M., Wientjens E., Klompaker, Van
der Sman J., Bernards R., Michalides R.J.A.M. (1997) Cdk-
independant activation of estrogen receptor by cyclin D1.
Cell , 88: 405-415.
- 20 - Portera-Cailliau, Price D.L., Martin L.J. Non-
NMDA and NMDA receptor mediated excitotoxic neuronal deaths in
adult brain are morphologically distinct: further evidence
for an apoptotic-necrosis continuum. 1997. *J. Comp. Neurol*
378: 88-104.
- 25 - Wiessner C, Brink I., Lorenz P., Neumann-
Haefelin T., Vogel P., Yamashita K. (1996) Cyclin D1
messenger RNA is induced in microglia rather than neurons
following transient forebrain ischemia. *Neuroscience* , 72:
947-958.
- 30 - Small D.L., Monette R., Comas T., Fournier
M.C., Morley P. (1999) Loss of cyclin D1 in necrotic and
apoptotic models of cortical neuronal degeneration.
Brain Research , 842 :376-383.
- 35 - Timsit S, Rivera S., Ouaghi P., Guischart F.,
Tremblay E., Ben-Ari Y., M. Khrestchatisky. Increased Cyclin
D1 in vulnerable neurons in the hippocampus after ischemia

and epilepsy: a modulator of *in vivo* programmed cell death ? (1999) *Eur. J. Neurosci.*, 1999. 11, 263-278.

- Oda H., Kasiske B.L., O'Donnell M.P., Keane W.F. (1999) Effects of lovastatine on expression of cell cycle regulatory proteins in vascular smooth muscle cells. *Kindney Int Suppl* 71, S202-S205.

- Rao S., Porter D.C., Chen X., Herliczek T., lowe M., Keyomarsi K. (1999) Effects of lovastatin on expression of cell cycle regulatory proteins in vascular smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* ; 96, 7797-7802.

- Muller C., Kiehl M.G., van de Loo J., Koch O.M. (1999) Lovastatin induces p21WAF1/Cip1 in human vascular smooth muscle cells: influence on protein phosphorylation, cell cycle, induction of apoptosis and growth inhibition.

- Hashemolhosseini S., Nagamine Y., Morley S.J., Desrivieres S., Mercep L., Ferrari S. (1998) Rapamycin inhibition of the G1 to S transition is mediated by effects on cyclin D1 mRNA and protein stability. *J. Biol. Chem* 273, 14424-14429.

- Diehl J.A., Cheng M., Roussel M.F., Sherr C.J. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. (1998) *Genes Dev.* 22, 3499-3511.

- Borner C et Monney L. Apoptosis without caspases: an efficient molecular guillotine ? *Cell death Differ* 6, 508-515 (1999).

- Kitanaka C., Kuchino Y. Caspases independant programmed cell death with necrotic morphology. *Cell death Differ*, 6, 508-515 (1999).

- Chautan M., Chazal G., Ceconni F., Gruss P., Golstein P. Interdigital cell death occur through a necrotic and caspase -independant pathway. (1999) *Curr Biol* 9, 967-970.

- MacManus JP, Fliss H., Preston E., Rasquinha I., Tuor U. (1999) Cerebral ischemia produces laddered DNA fragment distinct from cardiac ischemia and archetypal apoptosis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19: 502-510.
- 5 - Leski M.L., Valentine S.L, Coyle J.T. (1999) L-type voltage gated calcium channels modulate kainic acid neurotoxicity in cerebellar granule cells. *Brain Res.* 828: 27-40.
- 10 - Li H, Colbourne F, Sun P, Zhao Z, Buchan AM, Iadecola C. (2000) Caspase inhibitors reduce neuronal injury after focal but not global cerebral ischemia in rats. *Stroke* 31: 176-82.
- 15 - del Zoppo G., Ginis I., Hallenbeck J.M., Iadecola C., Wan X., Feuerstein G.Z. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. (2000) *Brain pathology* 10:95-112.
- 20 - Sanchez-Gomez M.V., Matute C. AMPA and kainate receptors each mediate excitotoxicity in oligodendroglial cultures. (1999) *Neurobiol Dis.* 6:475-485.
- Matute C., Sanchez-Gomez M.V., Martinez-Millan L., Mideldi R. (1997) Glutamate receptor -mediated toxicity in optic nerve oligodendrocytes. *P.N.A.S.* 94: 8830-8835.
- 25 - Kerr J.F.R., Willie A.H., Currie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetic. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.

REVENDEICATIONS

1) Utilisation d'une substance modulatrice de l'expression ou de la fonction d'une protéine impliquée dans le cycle cellulaire pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention des lésions neurales aiguës excitotoxiques non-apoptotiques.

2) Utilisation d'une substance modulatrice de l'expression ou de la fonction d'une protéine impliquée dans le cycle cellulaire pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention des lésions neurales aiguës excitotoxiques non-apoptotiques des neurones, des astrocytes, ou des oligodendrocytes, ou de leurs précurseurs, au cours de l'épilepsie.

3) Utilisation d'une substance modulatrice de l'expression ou de la fonction d'une protéine impliquée dans le cycle cellulaire pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention des lésions neurales aiguës excitotoxiques non-apoptotiques des neurones, des astrocytes, ou des oligodendrocytes, ou de leurs précurseurs, lors d'une ischémie cérébrale.

4) Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné au traitement ou à la prévention des lésions neurales aiguës excitotoxiques non-apoptotiques lors d'une ischémie cérébrale survenant au cours d'une situation provoquant une hypoxie ou une anoxie cérébrale.

5) Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que la situation provoquant une hypoxie ou une anoxie cérébrale est choisie parmi : un arrêt cardiaque, la mise en circulation extra-corporelle lors de

la chirurgie cardiovasculaire, la chirurgie des vaisseaux du cou nécessitant ou non un clampage des vaisseaux, les traumatismes crâniens.

5 6) Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 5, caractérisée en ce que la protéine impliquée dans le cycle cellulaire est une protéine nécessaire à la progression du cycle cellulaire.

10 7) Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la protéine impliquée dans le cycle cellulaire est produite par une cellule apte ou non à se diviser.

15 8) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que la substance modulatrice de l'expression ou de la fonction d'une protéine impliquée dans le cycle cellulaire est une substance capable de moduler la phosphorylation d'une cible, en l'augmentant
20 ou l'inhibant.

 9) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que la substance modulatrice de l'expression ou de la fonction d'une protéine
25 impliquée dans le cycle cellulaire est une substance modulatrice de l'expression ou de la fonction d'une cycline et/ou d'une cdk.

 10) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que la substance modulatrice de l'expression ou de la fonction d'une protéine
30 impliquée dans le cycle cellulaire est une substance modulatrice de l'expression ou de la fonction d'une cycline et plus particulièrement d'une cycline D et/ou d'une cdk.

11) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que la substance modulatrice de l'expression ou de la fonction d'une protéine impliquée dans le cycle cellulaire est une substance modulatrice de l'expression ou de la fonction de la cycline D1 et/ou de la cdk5 et/ou du complexe cycline D1/Cdk5.

12) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que la substance modulatrice de l'expression ou de la fonction d'une protéine impliquée dans le cycle cellulaire est choisie parmi :

- les inhibiteurs de l'expression des cyclines,
- les inhibiteurs de kinases cyclines dépendantes,
- les inhibiteurs du complexe cycline/kinases cyclines dépendantes.

13) Utilisation selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'inhibiteur de l'expression des cyclines est choisi parmi la rapamycine, la glycogène synthase kinase, les statines.

14) Utilisation selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'inhibiteur de kinases cyclines dépendantes est choisi parmi les analogues de purines par exemple les dérivés de l'olomoucine et roscovitine, les paullones, les indirubines, l'hymenisaldisine, le flavopiridol.

BEST AVAILABLE COPY

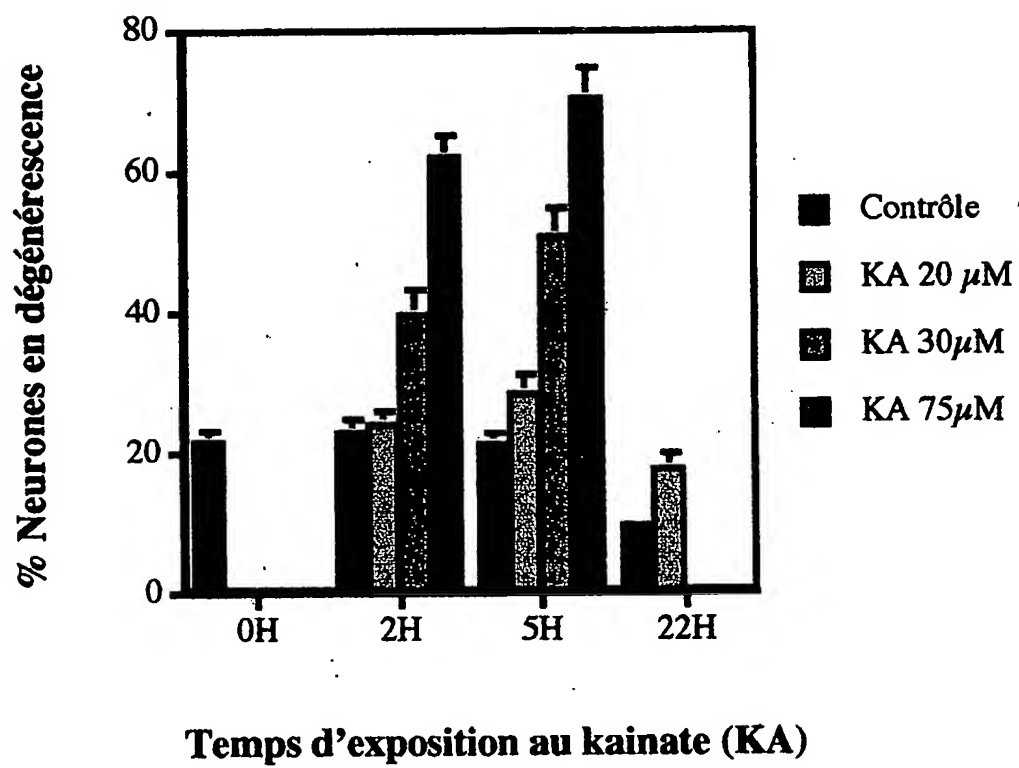


Figure 1

BEST AVAILABLE COPY

Fig.2 A



Fig.2 B



Fig.2 C



Fig.2 D



Fig.2 E



Fig.2 F



3/7

BEST AVAILABLE COPY

Fig.2 G



Fig.2 H

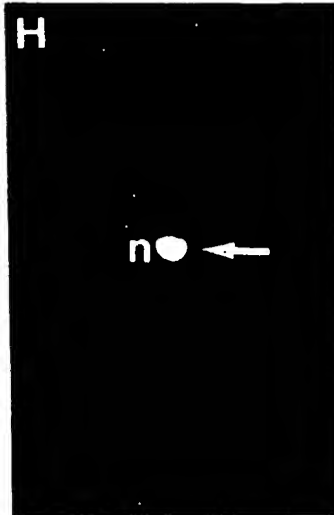


Fig.2 I

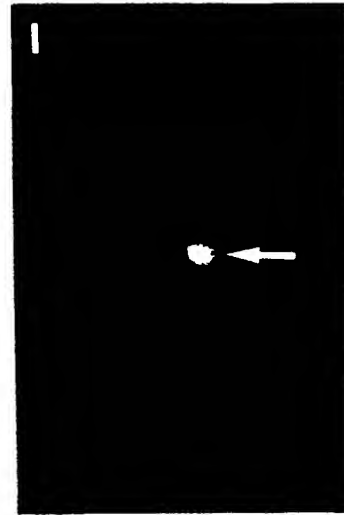


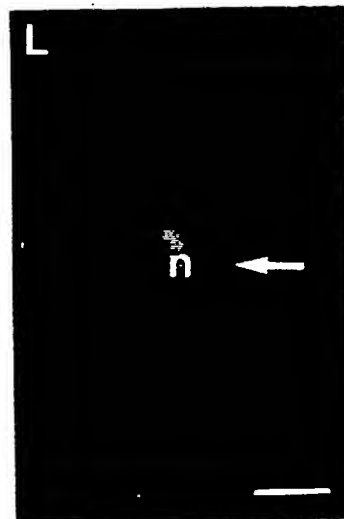
Fig.2 J



Fig.2 K



Fig.2 L



BEST AVAILABLE COPY

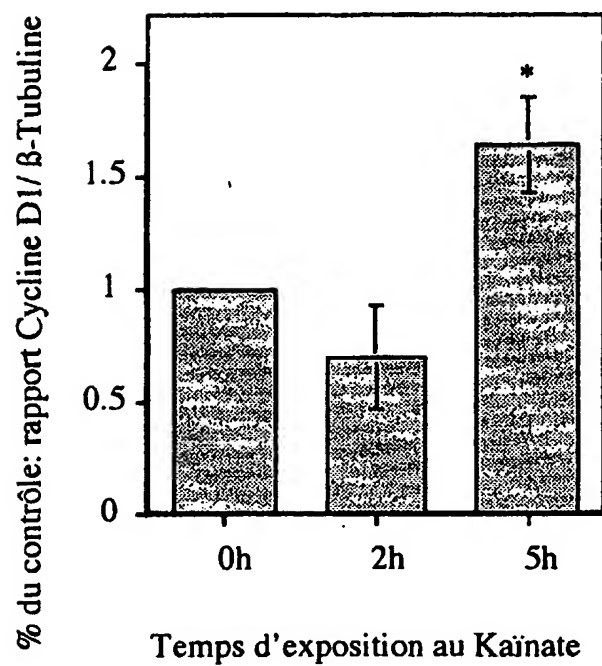


Fig.3 A

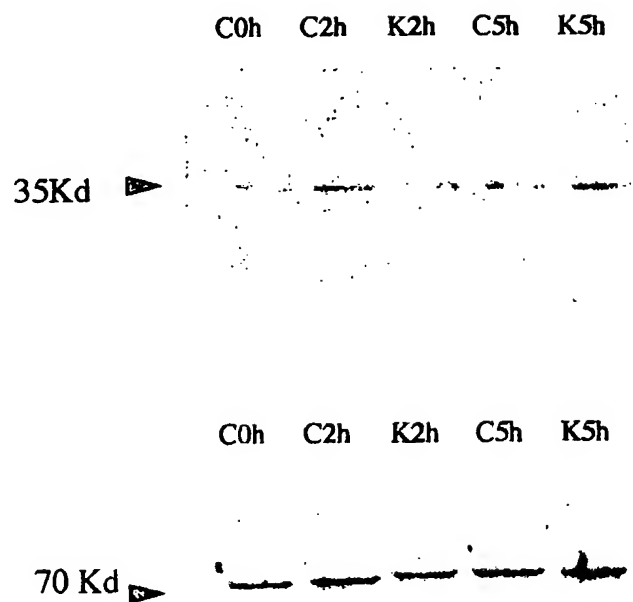


Fig.3 B

BEST AVAILABLE COPY

Fig.4 A



Fig.4 B



Fig.4 C

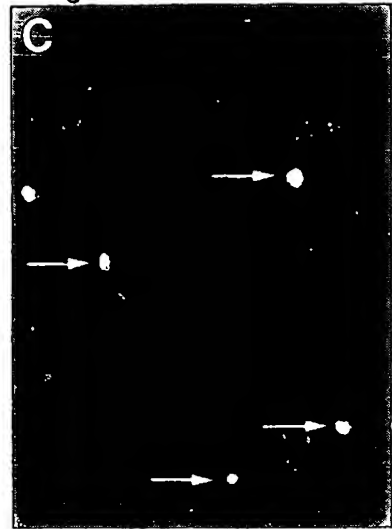


Fig.4 D

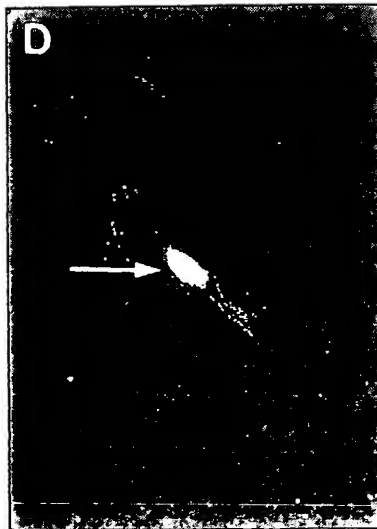


Fig.4 E

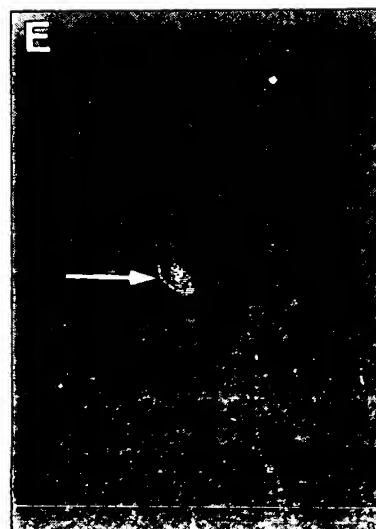


Fig.4 F



BEST AVAILABLE COPY

Fig.4 G



Fig.4 H

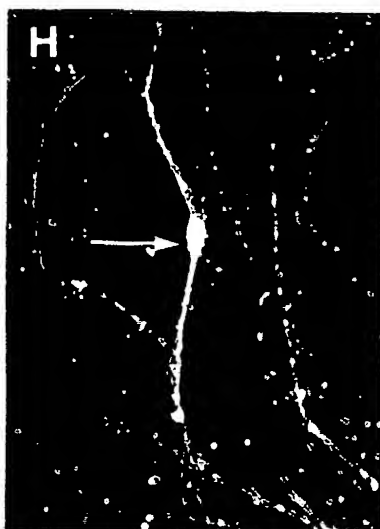
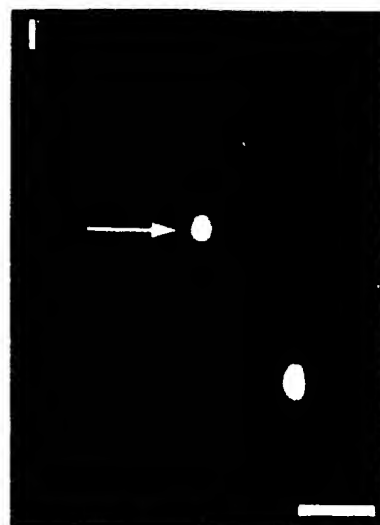
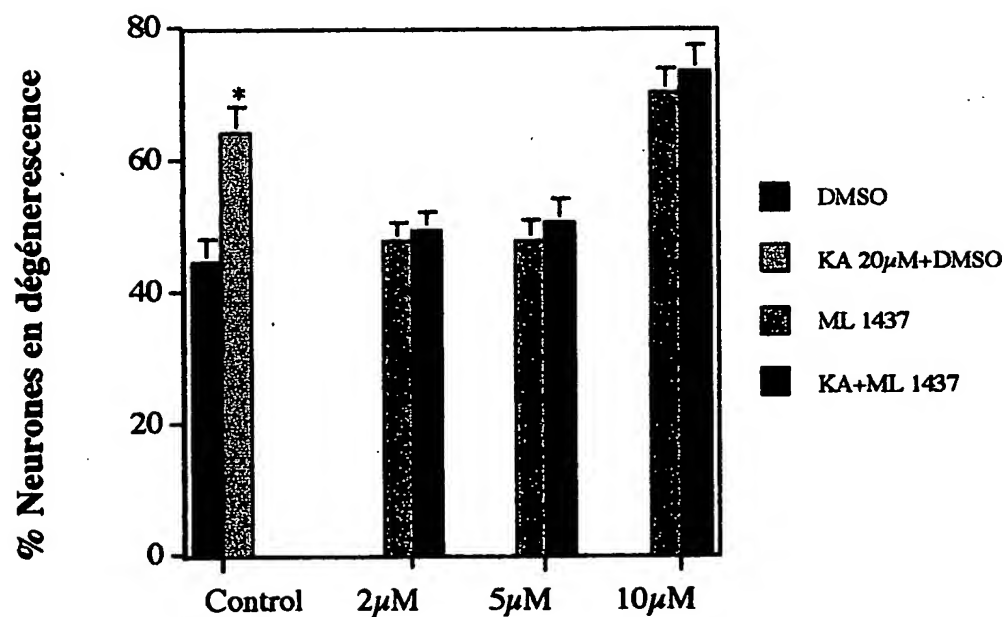


Fig.4 I



7/7

BEST AVAILABLE COPY



Concentration d'un analogue de la roscovitine

Figure 5

THIS PAGE